

Toksisitas dan Aktivitas Antimalaria Melalui Penghambatan Polimerisasi Hem Secara *In Vitro* Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Toxicity and In Vitro Antimalarial Heme Polymerization Inhibition Activity of Sambiloto (Andrographis paniculata) Leaf Extracts

Eris Septiana^{1*}, Demitra Gianni², dan Partomuan Simanjuntak^{1,2}

¹Puslit Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jl. Raya Bogor km 46, Bogor

²Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jl. Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan

*Korespondensi Penulis: septiana.eris@gmail.com

Submitted: 06-04-2016, Revised: 06-12-2017, Accepted: 06-12-2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.22435/mpk.v27i4.6499.255-262>

Abstrak

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) telah lama digunakan untuk mengobati malaria. Penelitian *in vitro* dengan parasit maupun melalui penghambatan polimerisasi hem dengan senyawa andrografolida dan *in vivo* dengan hewan uji terinfeksi telah dilakukan, namun demikian belum ada penelitian tentang penghambatan polimerisasi hem ekstrak dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan polimerisasi hem dan toksisitas ekstrak daun sambiloto. Daun sambiloto diekstraksi secara maserasi bertingkat berturut-turut menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol 70%. Uji antimalaria secara *in vitro* menggunakan metode penghambatan polimerisasi hem. Uji toksisitas menggunakan metode uji kematian larva *Artemia salina* (BSLT). Skrining fitokimia dilakukan secara kualitatif untuk seluruh ekstrak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 2.196,57; 1.235,54; dan 1.157,24 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% masing-masing memiliki nilai LC_{50} sebesar 1.155,79; 1.133,89; dan 5.229,15 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak etanol 70% mengandung alkaloid, flavonoid, steroid/triterpenoid, saponin, dan tannin. Ekstrak n-heksan dan etil asetat hanya mengandung alkaloid dan steroid/triterpenoid. Ekstrak etanol 70%, etil asetat, dan n-heksan daun sambiloto memiliki kemampuan dalam menghambat polimerisasi hem dan tidak toksik terhadap larva *Artemia salina*.

Kata kunci: *Andrographis paniculata*, polimerisasi hem, toksisitas

Abstract

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) has been used to treat malaria. *In vitro* research using parasite or through heme polymerization inhibition using andrographolide and *in vivo* using infected animal test have been done widely, however, heme polymerization inhibition from extracts with different polarity levels has not been studied yet. The aims of this study were to investigate the heme polymerization inhibition activity and toxicity of sambiloto leaf extracts. Sambiloto leaf extracted with gradually maceration using n-hexane, ethyl acetate, and 70% ethanol respectively. Heme polymerization inhibition activity was used as *in vitro* antimalarial test. Brine shrimp lethality test (BSLT) was used to determine toxicity of the extracts. Phytochemically screening was done for all extracts qualitatively. The results of this study were n-hexane, ethyl acetate, and 70% ethanol extracts had heme polymerization inhibition activities with IC_{50} values at 2,196.57; 1,235.54; and 1,157.24 $\mu\text{g/mL}$ respectively. N-hexane, ethyl acetate, and 70% ethanol have LC_{50} values at 1,155.79; 1,133.89; and 5,229.15 $\mu\text{g/mL}$ respectively. 70% ethanol extract contains alkaloid, flavonoid, steroid/triterpenoid, saponin, and tannin. N-hexane and ethyl acetate extracts has only contains alkaloid and flavonoid. 70% ethanol, ethyl acetate, and n-hexane extracts of sambiloto leaf have ability to inhibit heme polymerization and also non toxic to *Artemia salina* larvae.

Keywords: *Andrographis paniculata*, heme polymerization, toxicity

Pendahuluan

Malaria masih merupakan penyakit yang mendapat perhatian serius di seluruh dunia. Angka kasus kematian akibat penyakit malaria masih tinggi. Sekitar 500 juta kasus malaria telah dilaporkan dan lebih dari 1 juta orang meninggal tiap tahunnya di seluruh dunia.¹ Meskipun secara nasional tahun 2011-2015 terdapat kecenderungan penurunan kejadian malaria, namun masih terdapat daerah dengan tingkat kejadian malaria yang tinggi terutama di wilayah timur Indonesia.² Penyakit ini ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang membawa parasit *Plasmodium*. Parasit yang terbawa akan masuk ke dalam tubuh inang dan beredar dalam sistem peredaran darah. Parasit selanjutnya akan menyerang sel darah merah inangnya dan memecah hemoglobin untuk mendapatkan nutrisi. Proses pemecahan hemoglobin ini terjadi dalam vakuola makanan parasit yang bersifat asam. Dalam vakuola makanannya, parasit akan memecah hemoglobin menjadi globin sebagai sumber asam amino dan hem bebas sebagai hasil sampingnya. Hem bebas ini bersifat toksik bagi parasit, sehingga parasit akan mengubah hem bebas tersebut menjadi senyawa senyawa hemozoin yang tidak toksik guna mempertahankan hidupnya.³

Terjadinya kasus resistensi parasit terhadap obat antimalaria golongan kuinolon serta penyebaran resistensi yang meluas telah mendorong para peneliti untuk mencari obat antimalaria baru yang lebih efektif.³ Hasil temuan terkini menyebutkan bahwa parasit malaria diindikasikan mulai resisten terhadap artemisinin, yang merupakan obat antimalaria generasi terbaru dan direkomendasikan oleh WHO.⁴ Oleh karena itu perlu dilakukan upaya untuk mencari bahan obat baru salah satunya dari tanaman obat. Beberapa tanaman obat yang digunakan dalam pengobatan penyakit malaria antara lain daun pohon kapur, buah merah, daun benalu mangga, kulit buah manggis, buah sirih, kulit batang cempedak, kulit batang munda, dan daun bunga matahari.⁵

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan tanaman dari keluarga Acanthaceae yang memiliki rasa daun yang pahit. Tanaman ini telah lama digunakan oleh masyarakat Indonesia secara tradisional untuk mengobati beberapa penyakit termasuk juga malaria. Kemampuan sambiloto dalam mengobati penyakit malaria dikarenakan adanya senyawa utama yaitu *Andrographolide*.⁶ Selain andrografolida,

senyawa lain yang dilaporkan mempunyai aktivitas antimalaria yaitu senyawa *xanthones* yang dapat membunuh parasit *Plasmodium*.⁷

Pengobatan modern tidak hanya terfokus pada kandungan senyawa aktif suatu tanaman obat dalam mengobati suatu penyakit, akan tetapi juga harus diketahui toksisitas suatu tanaman obat terhadap manusia. Efek toksik bisa terjadi terhadap organ tubuh manusia seperti hati dan ginjal. Tingkat toksisitas suatu bahan obat berhubungan dengan interaksi senyawa kimia toksik dengan sel hati dan ginjal yang berfungsi sebagai penyaring.⁸ Oleh karena itu, pengujian tentang toksisitas sebuah bahan obat sangat penting dilakukan guna perlindungan penggunaannya.

Penggunaan ekstrak daun sambiloto sebagai antimalaria telah dilakukan baik secara *in vitro* menggunakan kultur *Plasmodium* maupun *in vivo* menggunakan hewan coba yang telah diinfeksi parasit.^{9,10} Begitu pula penggunaan senyawa tunggal andrografolida dalam menghambat polimerisasi hem telah dilakukan.¹¹ Akan tetapi, pengujian *in vitro* antimalaria melalui penghambatan polimerisasi hem ekstrak dengan tingkat kepolaran yang berbeda dan juga toksisitasnya belum dilakukan. Metode aksi antimalaria yang dapat dilakukan dan memberikan hasil yang dapat dipertanggungjawabkan ialah penghambatan polimerisasi hem.³ Sedangkan pengujian toksisitas secara *in vitro* sederhana dan banyak digunakan ialah metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).¹² Berdasarkan latar belakang yang telah dituliskan, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimalaria melalui penghambatan polimerisasi hem dan toksisitas secara *in vitro* dari ekstrak daun sambiloto.

Metode

Bahan uji berupa simplisia daun sambiloto diperoleh dari Balitro, Bogor, Jawa Barat, Indonesia.

Bahan kimia berupa n-heksan (Brataco, Indonesia), etil asetat (Brataco, Indonesia), etanol (Brataco, Indonesia), kloroform (Brataco, Indonesia) Hematin (Sigma, USA), Natrium Hidroksida (NaOH) (Merck, Germany), asam asetat glasial (Merck, Germany), Dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, Germany), air laut, telur udang *Artemia salina*, amonia 25% (Merck, Germany), asam klorida (HCl) (Merck, Germany), pereaksi Dragendorf, dietil eter (Merck, Germany), asam sulfat (H₂SO₄)

(Merck, Germany), serbuk Magnesium (Merck, Germany), amil alkohol (Merck, Germany), dan besi klorida (FeCl_3) (Merck, Germany).

Desain penelitian dilakukan menggunakan eksperimen deskriptif dengan variabel tetap yaitu ekstrak etanol 70%, n-heksan, dan etil asetat. Variabel peubah yaitu lima seri konsentrasi ekstrak pada uji penghambatan polimerisasi hem (125, 250, 500, 1000, dan 2000 $\mu\text{g/mL}$) dan tiga seri konsentrasi ekstrak pada uji toksisitas (10, 100, dan 1000 $\mu\text{g/mL}$). Respon penelitian yang diamati yaitu persen hambatan polimerisasi hem dan jumlah kematian larva udang.

Simplisia daun sambiloto terlebih dahulu dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Cibinong, Jawa Barat. Proses ekstraksi secara maserasi bertingkat. Simplisia daun sambiloto sebanyak 100 g direndam dengan 1 L n-heksan dalam toples kaca selama 24 jam. Filtrat dan ampas dipisahkan dengan penyaringan. Ampas kemudian berturut-turut direndam dalam etil asetat dan dilanjutkan dengan etanol 70% selama 24 jam. Setiap perendaman masing-masing pelarut dilakukan sebanyak tiga kali. Filtrat dari masing-masing pelarut diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* (Stuart®) hingga didapatkan ekstrak kental n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% daun sambiloto.

Penentuan aktivitas antimalaria melalui penghambatan polimerisasi hem dilakukan menurut Basilico¹³ dengan modifikasi. Sebanyak 100 μL larutan hematin 1 mM dalam larutan natrium hidroksida 0,2 M dengan seri konsentrasi mulai 250 sampai 3,9 μM (1:2) dimasukkan ke dalam lubang mikro 96 sumuran (Costar®) dan dibaca serapannya pada panjang gelombang 405 nm menggunakan microplate reader (Thermo Multiskan EX™) untuk membuat kurva baku hematin. Sebanyak 100 μL larutan hematin 1 mM dalam larutan natrium hidroksida 0,2 M dimasukkan dalam tabung mikro 1,5 mL (Axygen®), kemudian ditambahkan 50 μL bahan uji dengan konsentrasi 125, 250, 500, 1.000, dan 2000 $\mu\text{g/mL}$. Untuk memulai reaksi polimerisasi hem, ditambahkan 50 μL asam asetat glasial dan dimasukkan ke dalam inkubator (Thermo, Heraeus™) selama 24 jam pada suhu 37°C. Perlakuan sampel uji dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Sebagai kontrol negatif adalah akuades dan klorokuin sebagai kontrol positif.

Setelah inkubasi berakhir, tabung mikro disentrifugasi (Hitachi) dengan kecepatan 8000

rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan dicuci dengan 200 μL larutan dimetil sulfoksida (DMSO) sebanyak 4 kali dengan masing-masing pencucian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Endapan setelah pencucian kemudian dilarutkan dalam 200 μL natrium hidroksida 0,1 M. Sebanyak 100 μL larutan dimasukkan ke dalam lubang mikro 96 sumuran dan dibaca serapannya pada panjang gelombang 405 nm menggunakan *microplate reader* (Thermo, Multiskan EX™). Persen penghambatan dihitung berdasarkan persamaan (1) dan IC_{50} (kadar senyawa yang mampu menghambat polimerisasi hem hingga 50%) dihitung menggunakan analisis regresi linier.

$$\% \text{ Penghambatan} = (A-B) / A \times 100 \% \dots (1)$$

Keterangan:

A = kadar hematin kontrol negatif

B = kadar hematin bahan uji

Pengujian toksisitas *in vitro* menggunakan larva udang *Artemia salina*.¹² Air laut dimasukkan ke dalam bejana yang dibagi menjadi dua ruangan dengan sekat. Sejumlah 100 mg telur *Artemia salina* dimasukkan ke dalam salah satu ruang kemudian ditutup (kondisi gelap). Sisi ruang yang lain dibiarkan terbuka dengan diberi penerangan lampu selama 48 jam. Telur yang menetas dan berubah jadi larva digunakan dalam penelitian. Ekstrak yang diuji yaitu dari ketiga ekstrak dengan masing-masing dibuat seri konsentrasi 10, 100, dan 1.000 $\mu\text{g/mL}$ dalam air laut. Sebanyak total 30 ekor larva udang *Artemia salina* dibagi masing-masing 10 ekor ke dalam tiga wadah uji yang telah berisi larutan bahan uji dengan seri konsentrasi yang telah dibuat dalam air laut. Untuk setiap masing-masing konsentrasi dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Kontrol hanya berisi air laut dan larva udang tanpa penambahan bahan uji. Seluruh pengujian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah inkubasi, larva dihitung jumlah yang mati dan hidup dalam masing-masing pengujian. Nilai LC_{50} (kadar senyawa yang mampu membunuh larva hingga 50%) dihitung menggunakan analisis probit.

Skrining fitokimia secara kualitatif meliputi uji alkaloid, steroid/triterpenoid, kumarin, flavonoid, kuinon, saponin, dan tannin.¹⁴ Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan sampel dengan NH_4OH 25% dan kloroform ke dalam sampel. Filtrat berupa larutan organik

diekstraksi dengan HCl pekat. Lapisan asam kemudian ditambah beberapa tetes pereaksi Dragendorff. Terbentuknya endapan merah bata dengan pereaksi Dragendorff menunjukkan adanya alkaloid. Uji steroid/triterpenoid sampel dimaserasi dengan eter selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat kemudian diuapkan dalam cawan penguap. Ke dalam residu ditambahkan asam asetat glasial dan 1 tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna merah, hijau ungu dan akhirnya biru menunjukkan adanya kandungan steroid/triterpenoid. Uji kumarin dilakukan dengan cara sampel ditambahkan eter, kemudian disaring dan filtrat diuapkan. Setelah kering, ditambahkan air panas dan didinginkan. Setelah dingin ditambahkan larutan amoniak 10%. Adanya fluoresensi hijau atau biru pada sinar UV menunjukkan adanya kumarin.

Pada uji flavonoid, saponin, tanin dan kuinon, sampel dididihkan dalam air panas selama 5 menit, kemudian dibagi ke dalam 4 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan serbuk magnesium, HCl pekat dan amil alkohol. Kocok dengan kuat dan biarkan memisah. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan alkohol. Tabung kedua dikocok kuat secara vertikal. Terbentuknya busa setelah didiamkan 10 menit dan tidak hilang setelah penambahan HCl 2N menunjukkan adanya kandungan saponin. Tabung ketiga ditambahkan larutan FeCl_3 1%. Timbulnya warna hijau biru menunjukkan adanya kandungan tanin. Tabung keempat ditambahkan dengan NaOH 1N. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya kuinon.

Hasil

Determinasi simplisia menunjukkan bahwa simplisia yang digunakan adalah sambiloto, *Andrographis paniculata* (Burm.) Nees. dari suku Acanthaceae. Hasil pengujian penghambatan polimerisasi hem ekstrak daun sambiloto menunjukkan bahwa seluruh ekstrak pada seluruh seri konsentrasi menunjukkan kemampuan dalam menghambat polimerisasi hem dibandingkan dengan akuades sebagai kontrol negatif (Tabel 1). Ekstrak etanol 70% daun sambiloto memberikan nilai IC_{50} yang lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak n-heksan dan etil asetat, meskipun masih lebih besar jika dibandingkan dengan kontrol positif klorokuin. Hasil uji toksisitas menggunakan larva udang *Artemia salina* menunjukkan bahwa seluruh

ekstrak memiliki $\text{LC}_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$ (Tabel 2). Ekstrak etanol 70% menjadi ekstrak yang paling tidak toksik dengan nilai LC_{50} yang paling tinggi. Hasil skrining fitokimia secara kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% memiliki kandungan senyawa kimia yang lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak n-heksan maupun etil asetat.

Pembahasan

Penggunaan pelarut pada penelitian ini didasarkan pada tingkat kepolaran suatu pelarut. Tingkat kepolaran suatu pelarut dapat diketahui berdasarkan pada tetapan dielektrik. N-heksan, etil asetat, dan etanol berturut-turut mempunyai tetapan dielektrik sebesar 1,89; 6,02; dan 24,30. Semakin besar nilai tetapan dielektrik suatu pelarut, maka sifatnya akan semakin polar.¹⁵ Oleh karena itu n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% yang digunakan pada penelitian ini mewakili masing-masing pelarut non-polar, semi-polar, dan polar. Ekstraksi dapat dilakukan satu tahap atau bertahap sesuai tingkat kepolaran pelarut. Pada penelitian ini digunakan ekstraksi bertahap dimulai dengan pelarut non-polar sampai polar. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan ekstrak yang dapat dibedakan tingkat kepolarannya sehingga diperoleh komponen yang lebih murni dan tidak bercampur.¹⁶

Setelah masuk ke dalam sel darah merah inangnya, parasit *Plasmodium* akan memecah hemoglobin menjadi hem dan globin. Globin akan dipecah kembali menjadi asam-asam amino untuk nutrisi parasit. Hem bebas sebagai hasil samping pemecahan hemoglobin ini bersifat toksik bagi parasit maupun sel darah merah inang.³ Oleh karena itu, untuk mempertahankan hidupnya, parasit akan mengubah hem bebas menjadi hemozoin melalui proses polimerisasi sehingga menjadi tidak toksik. Pengujian *in vitro* menggunakan metode penghambatan polimerisasi hem ini merupakan salah satu metode untuk mengetahui mekanisme kerja bahan aktif sebagai antimalaria. Mekanisme yang terjadi merupakan interaksi antara bahan uji dengan sistem elektrolit hem dan atau gugus hidroksil dalam bahan uji yang berikatan dengan ion besi hem.¹³ Pada penelitian ini klorokuin digunakan sebagai kontrol positif dikarenakan mekanisme klorokuin sebagai obat antimalaria juga melalui penghambatan polimerisasi hem.³

Ekstrak etanol 70% merupakan ekstrak dengandayapenghambatantertinggidibandingkan dengan ekstrak yang lain karena memiliki nilai

IC₅₀ yang lebih kecil. Hal ini dikarenakan etanol 70% memiliki kandungan air yang tinggi (30%) yang dapat melarutkan komponen fitokimia secara maksimal dalam proses ekstraksi.¹⁷ Penelitian tentang antimalaria selain dari ekstrak daun sambiloto baik *in vitro* maupun *in vivo* dengan menggunakan pelarut dengan kepolaran berbeda telah banyak dilakukan. Ekstrak etanol daun *Phyllanthus amarus* memberikan hasil yang lebih menjanjikan sebagai antimalaria dibandingkan dengan ekstrak air pada percobaan antiplasmodium secara *in vivo*.¹⁸ Untuk pengujian antimalaria secara *in vitro* juga telah dilaporkan bahwa fraksi etanol bawang putih memberikan aktivitas penghambatan polimerisasi hem lebih baik dibandingkan dengan fraksi n-heksan dan etil asetat.¹⁹

Penelitian tentang kemampuan sambiloto dalam menghambat polimerisasi hem juga sudah dilakukan. Akan tetapi tidak menggunakan ekstrak kasar dengan tingkat kepolaran yang berbeda melainkan senyawa murni andrografolida. Andrografolida mampu menghambat polimerisasi hem dengan nilai IC₅₀ sebesar 367±µM atau sekitar 128 µg/mL.¹¹ Aktivitas tersebut lebih baik dibandingkan dengan kemampuan ekstrak kasar pada penelitian ini. Hal tersebut terjadi karena pada penelitian ini ekstrak masih berupa ekstrak kasar, sedangkan andrografolida merupakan senyawa murni sehingga aktivitasnya lebih baik.

Kandungan bahan toksik dalam suatu bahan obat sangat penting terutama menyangkut

pada perlindungan kesehatan masyarakat. Pesatnya perkembangan tanaman obat mengharuskan telaah lebih lanjut tentang aspek toksistas untuk memastikan keamanan dan efektivitas bahan alam berkhasiat obat. Pengujian toksistas suatu bahan obat dapat dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode ini merupakan metode yang ekonomis, membutuhkan jumlah bahan uji yang sedikit, cepat, dan dapat digunakan untuk mendeteksi bahan toksik dari ekstrak tanaman.²⁰ Selain itu, metode BSLT memiliki korelasi positif dengan pengujian secara *in vivo* menggunakan hewan coba.²¹

Hasil uji toksistas menunjukkan bahwa seluruh ekstrak memiliki nilai LC₅₀ > 1.000 µg/mL. Suatu ekstrak kasar dikatakan toksik jika memiliki LC₅₀ < 1.000 µg/mL dan tidak toksik jika memiliki nilai LC₅₀ > 1.000 µg/mL.¹² Oleh karena itu seluruh ekstrak daun sambiloto pada penelitian ini aman digunakan dengan ekstrak etanol 70% merupakan yang paling tidak toksik. Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa ekstrak tanaman sambiloto tidak memiliki efek toksik pada larva *Artemia salina*.²² Pengujian secara *in vivo* untuk mengetahui toksistas akut menggunakan hewan coba mencit juga menunjukkan bahwa ekstrak daun sambiloto masuk dalam kategori aman dengan nilai LD₅₀ > 5.000 mg/kg BB.²³ Dengan demikian seluruh ekstrak daun sambiloto pada penelitian ini aman digunakan pada manusia.

Tabel 1. Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem Ekstrak Daun Sambiloto

Bahan uji	Konsentrasi (µg/mL)	Kadar hematin (µM) ±SD	Penghambatan (%)	IC ₅₀ (µg/mL) ±SD
Ekstrak n-heksan	125	133,63±0,56	0,86	2196,57±94,16
	250	105,29±5,94	21,87	
	500	100,83±5,31	25,16	
	1000	94,63±1,38	29,78	
	2000	74,88±2,13	44,43	
Ekstrak etil asetat	125	112,63±2,13	16,42	1235,54±8,79
	250	109,29±9,94	18,91	
	500	88,58±6,44	34,27	
	1000	54,29±2,31	59,71	
	2000	51,25±1,63	61,96	
Ekstrak etanol 70%	125	126,21±7,69	6,33	1157,24±18,61
	250	108,00±5,38	19,86	
	500	77,13±0,50	42,76	
	1000	53,00±0,88	60,67	
	2000	46,88±1,75	65,21	

Klorokuin	62,5	117,88±1,19	12,52	698,85±6,93
	125	94,29±0,19	30,02	
	250	82,54±0,31	38,74	
	500	70,46±1,06	47,71	
	1000	56,71±0,26	57,92	
Akuades		134,75±0,38	0,00	

Tabel 2. Toksisitas Ekstrak Daun Sambiloto

Jenis ekstrak	LC ₅₀ (µg/mL)
n-heksan	1.155,79
Etil asetat	1.133,89
Etanol 70%	5.229,15

Kemampuan suatu tanaman berkhasiat obat berkaitan dengan kandungan senyawa kimianya. Hal ini dapat dilihat bahwa ekstrak etanol 70%, dengan aktivitas penghambatan polimerisasi hem terbaik, memiliki kandungan golongan senyawa kimia yang paling banyak dibandingkan dengan ekstrak n-heksan dan etil asetat. Empat senyawa golongan alkaloid yang diisolasi dari kulit batang tanaman *Cryptocarya nigra* dilaporkan memiliki aktivitas antimalaria dengan menghambat pertumbuhan parasit *Plasmodium falciparum*.²⁴ Senyawa golongan flavonoid yang diisolasi dari ranting dan daun tanaman *Caesalpinia bonduca* mempunyai aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium falciparum* ATCC 30932 strain FCR-3 maupun menghambat polimerisasi hem dengan membentuk kompleks kuersetin-hemin.^{19,25}

Tabel 3. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Sambiloto

Golongan senyawa	Ekstrak n-heksan	Ekstrak etil asetat	Ekstrak etanol 70%
Alkaloid	+	+	+
Flavonoid	-	-	+
Steroid/ triterpenoid	+	+	+
Saponin	-	-	+
Tanin	-	-	+
Kumarin	-	-	-
Kuinon	-	-	-

Keterangan:

+ = terdapat senyawa target

- = tidak terdapat senyawa target

Delapan senyawa golongan triterpenoid berhasil diisolasi dari kulit batang tanaman *Entandrophragma congoense* dan aktif menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* strain NF54 yang merupakan parasit sensitif klorokuin.²⁶ Golongan senyawa tannin berupa proanthocyanidins memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan nyamuk *Anopheles* penyebab penyakit malaria.²⁷ Sedangkan saponin yang diisolasi dari kulit pohon *Nauclea diderrichii* dilaporkan memiliki aktivitas antimalaria.²⁸

Kesimpulan

Ekstrak etanol 70%, etil asetat, dan n-heksan daun sambiloto memiliki kemampuan dalam menghambat polimerisasi hem dan tidak toksik terhadap larva *Artemia salina*.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan berupa isolasi dan identifikasi senyawa kimia murni dari daun sambiloto yang memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia atas dukungan dana melalui DIPA No. 079.01.2.450083/2015.

Daftar Pustaka

- Murray CJL, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al. Global malaria mortality between 1980-2010: a systematic analysis. Lancet. 2012;379:413-31.
- Infodatin: Pusat data dan informasi kementerian kesehatan RI. Malaria. [internet] 2016. [cited 5 Des 2017]. Available from: <http://www.depkes.go.id>
- Huy NT, Uyen DT, Maeda A, Trang DTX, Oida T, Harada S, et al. Simple colorimetric inhibition assay of heme crystallization for

- high-throughput screening of antimalarial compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:350-3.
4. Jiazhong L, Li S, Bai C, Liu H, Gramatica P. Structural requirements of 3-carboxyl-4(1H)-quinolones as potential antimalarials from 2D and 3D QSAR analysis. *J Mol Graph Model.* 2013;44:266-77.
5. Sopi IIPB, Tallan MM. Kajian beberapa tumbuhan obat yang digunakan dalam pengobatan malaria secara tradisional. *SPIRAKEL.* 2015;7(2):28-37.
6. Zaid OI, Majid RA, Sabariah MN, Hasidah MS, Al-Zihiry K, Yam MF, et al. Andrographolide effect on both *Plasmodium falciparum* infected and non infected RBCs membranes. *Asian Pac J Trop Med.* 2015;8(7):507-12.
7. Chowdury A, Biswas SK, Raihan SZ, Das J, Paul S. Pharmacological potentials of *Andrographis paniculata*: an overview. *Int J Pharmacol.* 2012;8(1):6-9.
8. Bello I, Bakkouri AS, Tabana YM, Al-Hindi B, Al-Mansoub MA, Mahmud R, et al. Acute and sub-acute toxicity evaluation of the methanolic extract of *Alstonia scholaris* stem bark. *Med Sci.* 2016;4(1):1-14.
9. Zein U, Fitri LE, Saragih A. Comparative study of antimalarial effect of sambiloto (*Andrographis paniculata*) extract, chloroquine and artemisinin and their combination against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Acta Med Indones.* 2013;45(1):38-43.
10. Widyawaruyanti A, Asrory M, Ekasari W, Setiawan D, Radjaram A, Tumewu L, et al. In vivo antimalarial activity of *Andrographis paniculata* tablets. *Procedia Chem.* 2014;13:101-4.
11. Risdawati. Mekanisme kerja andrografolida dari sambiloto (*Andrographis paniculata*, Nees) sebagai senyawa antimalaria: kajian terhadap status oksidatif *Plasmodium berghei* ANKA. [Disertasi] Jakarta: Universitas Indonesia; 2014.
12. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *J Med Plant Res.* 1982;45:31-4.
13. Basilico N, Pagani E, Monti D, Olliaro P, Taramelli D. A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:55-60.
14. Harborne JB. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.* 3rd edition. London: Chapman & Hall; 1998.
15. Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi. *Analisa bahan makanan dan pertanian.* Jogjakarta: Liberty; 1989.
16. Septiana AT, Asnani A. Aktivitas antioksidan ekstrak rumput laut *Sargasum duplicatum*. *Jurnal Teknologi Pertanian.* 2013;14(2):79-86.
17. Abdillah S, Tambunan RM, Farida Y, Sandhiutami NMD, Dewi RM. Phytochemical screening and antimalarial activity of some plants traditionally used in Indonesia. *Asian Pac J Trop Dis.* 2015;5:454-7.
18. Nwazue NR, Jacinta O, Wesley B. In vivo antimalarial effects of ethanol and crude aqueous extracts of phyllanthus amarus. *World Essays J.* 2013;1(4):115-24.
19. Manu S, Deshmukh R, Prasad KMN, Trivedi V. Screening and characterization of antimalarial heme polymerase inhibitors from garlic cloves. *European J of Med Plants.* 2013;3(3):474-84.
20. Gadir SA. Assessment of bioactivity of some Sudanese medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *J Chem Pharm Res.* 2012;4(12):5145-8.
21. Naidu JR, Ismail R, Sasidharan S. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of methanol extract of *Mentha spicata* L (Lamiaceae). *Trop J Pharm Res.* 2014;13(1):101-7.
22. Mamatha A. Brine shrimp lethality test of *Andrographis paniculata*. *Res J Pharm Technol.* 2014;7(7):743-5.
23. Katrin E, Susanto, Winarno H. Keamanan sambiloto (*Andrographis paniculata* nees) kering yang diiradiasi gamma berdasarkan aspek toksisitas akutnya terhadap mencit galur swiss Webster. *Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia.* 2014;15(2):103-18.
24. Nasrullah AA, Zahari A, Mohamad J, Awang K. Antiplasmodial alkaloids from the bark of *Cryptocarya nigra* (Lauraceae). *Molecules* 2013;18:8009-17.
25. Ogunlana OO, Kim HS, Wataya Y, Olagunju JO, Akindahunsii AA, Tan NH. Antiplasmodial

- flavonoid from young twigs and leaves of *Caesalpinia bonduc* (Linn) Roxb. J Chem Pharm Res. 2015;7(1):931-7.
26. Happi GM, Kouam SF, Talontsi FM, Lamshoft M, Zuhlke S, Bauer JO, et al. Antiplasmodial and citotoxicity triterpenoids from the bark of the Cameroonian medicinal plant *Entandrophragma congoense*. J Nat Prod. 2015;78(4):604-14.
 27. Muema JM, Bargul JL, Nyanjom SG, Mutunga JM, Njeru SN. Potential of *Camelia sinensis* proanthocyanidins-rich fraction for controlling malaria mosquito populations through disruption of larval development. Parasit Vectors. 2016;9:1-10.
 28. Lamidi M, Olivier E, Gasquet M, Faure R, Nze-Ekekang L, Balansard G. Structural and antimalarial studies of saponins from *Nauclea diderrichii* Bark. dalam: Waller GR, Yamasaki K (Eds). Saponins used in traditional and modern medicine. New York: Springer; 1996.